

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 25日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790186

研究課題名(和文) ラット単離胃粘膜を用いた胃小窩壁細胞剥離現象の解析と胃酸分泌関連疾患への応用展開

研究課題名(英文) Exfoliation of gastric pit-parietal cells into the gastric lumen associated with a stimulation of acid-secretion observed in isolated rat gastric mucosa model .

研究代表者

豊嶋(青山)典世(TOYOSHIMA/AOYAMA FUMIYO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：10468035

研究成果の概要(和文)：ラット単離胃粘膜実験モデルで見出された胃小窩壁細胞剥離現象の詳細を明らかにし、びらん性胃炎等の胃酸分泌関連疾患との関連性を検討した。本研究では、この実験モデルと凍結技法を応用してヒスタミン、H₂レセプター拮抗剤、プロトンポンプ阻害剤に代表される酸分泌に関連した試薬が壁細胞剥離現象に与える影響を検討し、NSAIDs(非ステロイド性消炎鎮痛剤)投与による実験潰瘍モデルを確立した。胃酸分泌に強力に与る胃小窩壁細胞の制御が可能になれば、胃酸分泌関連疾患の新たな予防法や治療法の開発に寄与できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Gastric parietal cells of the gastric gland (especially at the pit) are highly differentiated cells responsible for the gastric hydrochloric acid secretion into the lumen of the stomach. We have recently noted that a number of pit-parietal cells were exfoliated into the lumen of isolated rat gastric mucosa model, and applied the cryo-techniques to elucidate the fine structure and histochemical characteristics in the process of cell exfoliation. Quantitative analysis verified a time-dependent increase in the number of cell exfoliation in the gastric mucosa isolated under acid-stimulation by histamine treatment compared with under acid-inhibition by H₂-antagonist or proton pump inhibitor (PPI) treatment. Furthermore, an in vitro preliminary model of gastric erosion has been established with NSAIDs (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) treatment. Acceleration of the cell exfoliations may result in the breakdown of gastric epithelial continuities. Therefore the sealing of the basal spot of exfoliated pit-parietal cells by neighboring mucous cells seems profitable to prevent an epithelial deficiency leading to gastric erosion and ulcer.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：細胞・組織，胃粘膜，壁細胞，超微形態，オートファジー

1. 研究開始当初の背景

胃粘膜上皮は峽部の幹細胞から分化し、上方移動あるいは下方移動しながら機能を有した細胞（表層粘液細胞・副細胞・壁細胞・主細胞・内分泌細胞）へ変化する。なかでも壁細胞は、上方移動し胃小窩へ分布する**胃小窩壁細胞**と腺体部から腺底部に分布する腺体部壁細胞とに分かれ、主として胃小窩壁細胞が胃酸分泌に与ることが知られている。壁細胞に関する研究は、1980年代に確立された単離胃底腺や初代培養壁細胞といった *in vitro* 実験モデルによって進展がもたらされたが、これらの実験モデルでは酵素処理によって峽部が分断される難点があった。そこで、我々は生体の胃粘膜に近い組織形態を保ち、すぐれた試薬反応性が得られる「**ラット単離胃粘膜モデル**」を独自に開発し (Sawaguchi et al., Arch Histol Cytol, 2005)、その応用研究の過程で摂食刺激を加えたラットの胃小窩壁細胞が胃内腔へ剥離する現象を初めて見出した (Aoyama et al., Histochem Cell Biol, 2008)。この現象は胃小窩壁細胞に特異的なもので、腺体部壁細胞やその他の上皮細胞には見られない。

この現象で特に着目すべきは、剥離する壁細胞に隣接する粘液細胞が細胞質の一部から成る足様突起を基底膜に沿って伸長させ、剥離する壁細胞の基底側を裏打ちするシーリング機構の存在である。仮に胃酸分泌刺激により壁細胞の剥離が亢進し、胃粘膜上皮の連続性が破綻すれば、「びらん性胃炎」の起点となる可能性が高い。臨床における非ステロイド性消炎鎮痛剤 (NSAIDs) 内服に起因する胃炎の多くは「びらん性胃炎」という病

態を呈するが、これは胃小窩壁細胞の剥離亢進や粘液細胞のシーリング機構に不具合が生じ、生体の胃粘膜上皮維持機構が破綻することが胃酸分泌関連疾患発症の契機となりうることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究はラット単離胃粘膜モデルで見出された胃小窩壁細胞剥離現象の詳細を明らかにし、びらん性胃炎をはじめとする胃酸分泌関連疾患との関連性を検討することを目的とする。これまでの研究から壁細胞剥離現象と酸分泌刺激（再摂食刺激）との間に相関性が認められ、剥離前後の壁細胞内ではプロトンポンプを有する頂上膜がオートファジーを介して処理されるという興味深い所見が得られている。この壁細胞剥離の制御が可能となれば、新たな胃酸関連疾患の予防や治療法の開発に繋がるものと期待される。

3. 研究の方法

初年度は単離胃粘膜実験モデルと凍結技法を応用して、ヒスタミン、H2 レセプター拮抗剤、プロトンポンプ阻害剤に代表される胃酸分泌に関連する試薬が壁細胞剥離現象及ぼす影響を検討した。これは酸分泌動態と壁細胞剥離現象との関連性を明らかにする上で基礎となる実験系である。胃小窩に存在する上皮細胞は、表層粘液細胞と胃小窩壁細胞の二種類であるが、両者のターンオーバーにはパラドックスがみられる。表層粘液細胞のターンオーバーは通常2～3日であるが、壁細胞は約2ヶ月とされている。しかし、実際の胃小窩最表層（胃内腔）面には表層粘液

細胞のみが存在する。酸分泌を担う胃小窩壁細胞が上方移動の過程で胃内腔に剥離していく場合、一時的に胃粘膜上皮が部分欠損する状態が起こりうると仮定できる。単離胃粘膜モデルにおける観察においては、胃小窩壁細胞剥離現象は酸分泌刺激時に亢進しており、ストレス下で胃酸や消化酵素に曝された生体胃における上皮欠損は、ここを起点とする生体防御システムの脆弱性に因るものと示唆される。胃粘膜上皮連続性の破綻の過程を単離胃粘膜実験モデルで再現し、そのメカニズムを詳細に解析することは胃炎や胃潰瘍といった胃酸分泌関連疾患の原因究明にむけた最初の糸口となりうるもので、各種薬剤刺激に単離胃粘膜がどのように反応するかを解析し、酸分泌と壁細胞剥離現象の因果関係を明らかにした。

次年度はびらん性胃炎実験モデル確立に着手し、臨床でよく使用されるNSAIDsを投与した実験潰瘍モデルを作成し検討した。NSAIDs投与により胃粘膜防御機構は低下するため、絶食ラットの胃粘膜単離後に更なる酸分泌刺激負荷を加えると、胃小窩壁細胞剥離が亢進すると推定された。さらに、NSAIDsに起因した粘液細胞のシーリング機構の減弱性がみられると仮定した場合、剥離で生じた上皮欠損部を埋めきれずに部分的なびらんを生じる事が想定され、びらんを生じた単離胃粘膜を光学顕微鏡レベルに加え電子顕微鏡レベルで詳細に観察し、壁細胞剥離現象とびらん発生の因果関係を超微形態科学的に解析した。

4. 研究成果

初年度は、単離胃粘膜実験モデルと凍結技法を応用してヒスタミン、H2 レセプター拮抗剤、プロトンポンプ阻害剤に代表される酸

分泌に関連する試薬が壁細胞剥離現象に与える影響を検討した。食餌条件を変えたラットの胃から単離胃粘膜を作製し、薬物添加培養液中で5~90分刺激して各薬剤の反応性を比較検討した結果、絶食したラットから作製した単離胃粘膜にヒスタミンを添加した(=酸分泌刺激した)場合、培養時間経過により胃小窩への壁細胞剥離数が増加した。一方、再摂食させたラットにH2 レセプター拮抗剤を作用させた(=酸分泌抑制した)場合はこの現象が抑制された。プロトンポンプ阻害剤を作用させる同様の培養実験を行ったところ、H2 レセプター拮抗剤と同様に剥離現象が抑制された。これらの結果から、酸分泌と壁細胞剥離現象との正の相関性が示された。

剥離後の胃小窩壁細胞の細胞死に関する免疫組織化学的解析の結果、MAP1LC3(酵母のオートファジー必須因子 Atg8 の哺乳類アナログ microtubule-associated protein light chain 3) 陽性であり、壁細胞剥離現象にはオートファジーを介したメカニズムが関与することが示唆された。

次年度は、NSAIDsの代表であるアスピリン(アセチルサリチル酸)投与によるびらん性胃炎(実験潰瘍)モデルの確立を目標として実験を行った。アスピリンを経口投与した絶食ラットから単離胃粘膜を作製し、薬液添加培養液中で5~90分培養した結果、酸分泌刺激時と同様に胃小窩壁細胞剥離が確認された。一部の単離胃粘膜には、胃小窩より上方に上皮傷害がみられた。一方、コントロール群となる絶食ラットより作製した単離胃粘膜培養では同様の現象はみられなかった。

一般にNSAIDsは胃粘膜防御機構を低下させると言われるが、その発生機序には諸説があり、病理組織学的な詳細は今なお明らかにされていない。NSAIDs投与単離胃粘膜モデルにおいては、表層粘液細胞の上皮欠損部を

補うシーリング機構の減弱が想定され、その結果として部分的なびらんを生じたものと考察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Aoyama F., Sawaguchi A:

Functional transformation of gastric parietal cells and intracellular trafficking of ion channels/transporters in the apical canalicular membrane associated with acid secretion. Biol Pharm Bull. (2011) 34: 813-816 (査読有)

<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.34.813>

② 澤口 朗、豊嶋 典世、高圧凍結技法による胃粘膜の超微形態研究、顕微鏡、査読無、45 巻、2011、130-132

[学会発表] (計4件)

① 豊嶋 (青山) 典世、高橋 伸育、井手 惣幸、澤口 朗

凍結技法と単離胃粘膜モデルを応用した胃酸分泌関連疾患の病態解析. 第117回日本解剖学会総会全国学術総会(2012. 3. 28), 山梨大学/甲府市

② 豊嶋 (青山) 典世、杉原ひとみ、高橋 伸育、井手 惣幸、澤口 朗

凍結技法を用いたラット胃小窩壁細胞の分化における糖鎖構造(TF抗原)の発現. 日本顕微鏡学会第53回九州支部総会学術講演会(2011. 12. 03), 熊本大学/熊本市

③ 澤口 朗、豊嶋 典世、菅沼龍夫

高圧凍結技法による胃粘膜の新たな超微形態研究. 日本顕微鏡学会第67回学術講演会(2011. 05. 18), 福岡国際会議場/福岡市

④ 澤口 朗、豊嶋 典世

凍結技法の優れた形態保持による胃酸分泌膜動態に関する機能形態学的研究. 第115回

日本解剖学会総会全国学術総会(2010. 03. 28), 岩手医科大学/盛岡市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊嶋 (青山) 典世 (TOYOSHIMA/AOYAMA FUMIYO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 10468035

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: